

포괄적 전사인자 분석을 위한 Degenerate RT-PCR/SSCP - Tumor Necrosis Factor- α 처리한 3T3-L1 지방세포에 적용 예 -

포천중문 의과대학교 내과학 교실, 가톨릭대학교 의과대학 생리학 교실¹

김유리 · 이상화 · 최영길 · 장서윤¹ · 김연수 · 김수경 · 박석원 · 박원근 · 조용욱 · 이상종

Transcription Factor Profile by Degenerate RT-PCR/SSCP
- Application in 3T3-L1 Adipocyte Treated with TNF- α -

Yoo Lee Kim, Sang Hwa Lee, Young Kil Choi, Seo-Yoon Chang¹, Yun Soo Kim, Soo Kyung Kim
Seok Won Park, Won Kun Park, Yong Wook Cho, Sang Jong Lee

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Pochon CHA University; and
Department of Physiology¹, College of Medicine, The Catholic University of Korea

Abstract

Background: Several high-throughput gene analysis techniques - differential display PCR, suppression subtraction hybridization (SSH), serial analysis of gene expression (SAGE), and DNA microarray - have permitted transcriptome profiling to understand the molecular pathogenesis of multifactorial diseases. But these techniques are of no great utility regarding feasibility, reproducibility, cost, and the amount of material required for analysis. To establish more practical method for transcription factor transcriptome profiling, we combined degenerate reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and single strand conformational polymorphism (SSCP) technique.

Methods: We categorized 417 human/mouse transcription factor mRNA into 92 small groups according to homology with ClustalW method and established 92 degenerate RT-PCR including common motives of the 92 small groups with the software program of CODEHOP, Primer Premier, Amplify 1.2. Further analysis on the amplified PCR products was performed by SSCP. This system was applied for the evaluation of changes on transcription factor transcriptome of differentiated 3T3-L1 adipocyte treated with TNF- α .

Results: 82 groups and 52 groups showed amplification of PCR before and after TNF- α treatment respectively and 24 groups showed significant amplification difference after TNF- α treatment. After TNF- α treatment for 48 hours, mRNA expressions of group 7, 30, and 33 which include adipocyte related transcription factors such as CEBP- α , RXR- α , PPAR- γ were downregulated and mRNA expression of group 8 including preadipocyte abundant CEBP- β was upregulated. These results are largely concordant with the results analyzed by oligonucleotide microarray. Randomly selected single PCR bands of group 28 and 75 on agarose electrophoresis displayed additional multiple bands by SSCP and necessitated addition of this technique to degenerate RT-PCR for further analysis.

Conclusion: It could be suggested that degenerate RT-PCR/SSCP is practical method and could be used as a screening test for transcriptome profiling of various disease states with further validation study. (*J Kor Diabetes Assoc* 31:410-420, 2007)

Key words: RT-PCR (reverse transcriptase polymerase-chain reaction)/SSCP (single strand conformational polymorphism), Transcriptome profiling, TNF- α , 3T3-L1 adipocyte

접수일자: 2007년 6월 27일, 통과일자: 2007년 8월 27일, 책임저자: 최영길, 포천중문 의과대학교 내과학교실

* 2004년 대한당뇨병학회 오츠카 연구비 수혜.

서 론

현재 인간 게놈에는 250,000~1,000,000의 단백질을 지령하고 있는 40,000~70,000개 정도의 유전자가 있고 이들 유전자의 전사를 약 10,000개의 전사인자(transcription factor)가 조절하는 것으로 추정하고 있다. 유전자 염기배열정보를 수용하여 전사된 mRNA를 일컫는 전사체(transcriptome)는 이후 단백질 합성으로 그 정보를 전달할 뿐 아니라 유전체와 단백질 군에 의해서도 그 발현 양상이 조절되므로 유전체 기능의 복잡한 네트워크에서 핵심적 축으로 작동하고 있다. 이처럼 동일한 유전자의 염기서열로 부터 해부학적, 상황적, 시간적으로 변화하는 전사체의 전체모습을 해석하여 유전자의 기능을 연구하는 분야를 전사체학(transcriptomics) 이라고 한다¹⁻³⁾.

전사체학 연구의 중요 분석기술은 1) cDNA의 random sequencing을 통한 EST (expressed sequence tag) / SAGE (serial expression of gene expression) 분석, 2) PCR (polymerase chain reaction)에 기초한 mRNA display 분석, 3) differential hybridization법으로 cDNA microarray와 oligo microarray chip 분석 등을 들 수 있다⁴⁾. 그러나 이들 기술은 실용적 측면에서 유용성이 높다고 말할 수 없는데 그 이유는 1)의 경우 체계적이고 재현성이 있는 분석이 매우 어려우며, 2)의 경우 대량 분석이 어렵고, 3)의 경우 비용이 많이 들고, 분석기술 자체가 어려우며, 많은 시료량이 필요할 뿐 아니라 재현성이 낮기 때문이다.

당뇨병, 고혈압 등의 성인병을 포함한 많은 질병이 다양한 유전적 인자와 환경 인자가 상호 작용하여 발병하는 다인성 질병으로, 이들의 병태생리를 이해하는데 관련 유전자 발현의 포괄적 분석과 종합적 해석이 필요하므로 전사체학적인 접근을 필요로 한다⁵⁻⁶⁾. 이에 본 연구자 등은 유전자 발현을 조절하는 전사인자의 전사체 분석을 용이하게, 저렴한 비용으로, 많은 수를 동시에 할 수 있는 실용적 방법으로 RT-PCR (degenerate reverse transcription-polymerase chain reaction) / SSCP (single strand conformation polymorphism) 시스템을 구축하고 이 방법의 효용성을 알아보고자 하였다.

특정 질병과 연관된 전사인자 전사체 발현 양상을 연구한 많은 연구가 한 두 가지의 특정 전사인자를 대상으로 시행된 것이라면 본 연구에서는 많은 전사인자의 발현의 변화를 포괄적으로 살펴볼 수 있는 방법을 찾고자 400개 이상의 전사인자 염기서열을 수집하고^{7,8)} 이들을 비슷한 염기서열을 보이는 것끼리 92개의 소그룹으로 나누었다. 각 전사인자 소그룹을 대표할 수 있는 degenerate PCR 프라이머를 작성하여 92개의 전사인자 전사체 degenerate RT-PCR 만 들었다^{9,10)}.

PCR 이 대상 유전자 DNA를 증폭하는 반면 RT-PCR은 DNA로 부터 전사된 mRNA를 DNA로 역전사하여

complimentary DNA (cDNA)를 합성하고 이를 증폭하는 기술로¹¹⁾ 증폭을 시작할 때 증폭하려는 DNA영역의 양쪽 끝 염기서열을 포함하는 프라이머(primer)가 필요한데 본 연구에서는 이를 degenerate primer로 작성하였다. Degenerate primer는 염기서열상의 유사성을 고려하여 유사한 염기서열에 결합할 수 있도록 하나의 위치에 두 개 이상의 염기가 존재하는 primer를 말하는데 본 연구에서는 이러한 degenerate primer의 특성을 이용하여 많은 전사인자의 발현양상을 적은 수의 RT-PCR을 통하여 살펴볼 수 있도록 하였다.

PCR을 통해 증폭된 DNA의 다형성을 조사하는 방법으로 본 연구에서 사용한 SSCP 방법은 증폭된 DNA 단편을 변성시켜 한 가닥의 DNA로 만들면 이는 불안정하여 DNA 한 가닥 안에서 염기 쌍을 형성한다는 특성을 이용하는데 이렇게 형성된 염기 쌍은 염기 배열에 따라 특이한 구조를 형성하므로 염기 배열이 변이에 의해 달라지면 구조가 달라져 polyacrylamide gel에서 다른 속도로 이동하므로 다른 위치에 밴드를 보인다¹²⁾.

본 연구에서 구축한 방법의 효용성을 알아보기 위하여 쥐의 지방세포주인 3T3-L1 지방세포를 대상으로 TNF- α 처리 전 후의 전사인자 전사체 분석에 적용해 보았다. 자세한 기전은 알려져 있지 않지만 TNF- α 가 비만과 연관된 인슐린 저항성에 중요한 역할을 한다는 많은 증거가 있다. 비만한 사람의 지방과 근육조직에서 TNF- α mRNA와 단백질의 과발현이 보고되어 있고¹³⁻¹⁷⁾ 이는 지방조직의 분해를 증가시켜 혈액 중의 유리지방산을 증가시키고 만성적으로 증가된 유리지방산은 발초조직의 인슐린저항성 증가시킨다고 알려져 있다¹⁸⁾. 또한 TNF- α 는 IRS-1 (insulin receptor substrate)에 있는 serine의 인산화를 촉진시키고 결과적으로 인슐린에 의한 IRS-1의 tyrosine 인산화를 감소시킴으로써 인슐린 저항성 증가에 기여한다^{19,20)}. 본 연구에서는 완전히 분화된 쥐의 지방세포에 TNF- α 를 처리하여 IRS-1 발현의 감소를 관찰하였으며 이를 인슐린저항성이 유발된 소견으로 간주하고 TNF- α 처리 전후의 전사인자 전사체 발현의 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 전사인자 염기서열 확보 및 그룹화

Swiss-PROT, NCBI-BLAST, EMBL-EBL, FASTA 등으로 부터 인간 및 생쥐 전사인자 mRNA 염기서열을 수집하고 지금까지 정립 보고된^{7,8)} 5개의 superclass (basic domains, zinc-coordinating DNA-binding domain, helix turn helix, beta-scaffold factors with minor groove contacts, other transcription factors)와 33개의 class로 분류한 다음 다시 DNASTAR MegAlign™ 5 (DNASTAR Inc.)를 활용하여 Clustal법으로 쌍정렬(pairwise

Table 1. Degenerate primer sequences of transcription factor RT-PCRs

Primer	Forward	Reverse	Size (bp)
1	CCTCCCGTGTAYRCNAAYYT	CAGGGTCTTCACYTTNTCYTC	399
2	CATCACCACCTCCCAGGAACYYTNCANTGGHT	CGCCGGTTCGGCAYTTNGCNGC	357
3	CCCTTCCCCATCGACAAGATHRTNAAYYT	CAGCTTCACGATGTTGTCCARYTTNCKYTT	177
4	ACGAGAAGCGGCAGAAGTTYTNGARMG	GGTCACGGGGCARTCYTTRTG	201
5	TCCGTGATCCAGTCCCNCAAGTNC	CGCCGTCGGTGCCRTTRTTNGC	378
6	GCCGCCACCGNGAYATGCC	TCCAGCTCCTCGATCAGCKTYTTRTTYTG	270
7	CGCCGCCGGGTWYGGNTGYGC	CGGCCCGGAGCCNCCNCCNCC	450
8	GGCACCCCCCCCCNGCNGAYGC	GCTCCCGGGACAGCTGYTCNACYTT	273
9	GGCAGCGGCGGGARMGNAAYAA	CCCTCTGGTGCAGCCTCTCRTTYCNKC	126
10	TCTGGGACAAGACCATCCCNATAYGAYGG	ACCTTCCTGGCCTTCTTCATNATNGGYTG	450
11	CCCGGACTCCTACTCCGGNYTNCNGG	CCACGCCGACACCTTTYTCYTCYTC	489
12	GGCAGCCTCCATGTNGSNRC	CCTTCTCCCGCTCGATCTTYGYTCNGG	411
13	ACCCACTCCGAGACCGARWSNCGNTT	TCTCGATCTTGGACAGCTTCTTRTCNCGNGG	321
14	ACCGTCTACCAGTTCTGCCAYSCNMNGA	GGAAGGCGTTGGTCTGCAYCCANVNCCA	153
15	CCTGCCCCGCCAACYTNCNAAYAT	CCCGGGCCTGCATCTCNARYTCYTG	363
16	CGCCACCTTCGCCGANCMNAAYRT	TCCTGAGGGGTCATCATCACRWARAAYTG	492
17	GCCCCGCCGTGTACTTYTGGMGNA	CCAGTCCCCGTCCATGAARAANYKNTG	588
18	CCGTACTTCTACTGCGACTACGANTGYGGNGA	GGAGAAGCCGGACCARATRCARTC	390
19	CATCGAGGTGGAGTCCGAYGARGARCA	GGAGGAGGAGTCGGAGCCNCCRTCRAC	408
20	ACATCCAGATGCTGCTGGARGCNGCNGANT	CGGTGCGACTCCTCCARYTTYTKDAT	348
21	AGGACGAGTTCACCCCTTYATHGARGC	CGGTGGAATCCAGGGGNATNCCYTT	411
22	CGTGTACCCCGCCARGTNCARWA	CATGAAGATGGACCGGATGADYTTNCCRAA	594
23	CCTGCTGACCTCCCTGGTNGARGGNRA	TGGCCTTCAGGGCCTCTKTNADRARTT	393
24	CGCCGGCCGGAAYGAYTGAT	CCGGCGTACACGACCTCNGGYTCDAT	339
25	TCCCTGCTGGGCCCACNNTTYCC	GACAGGTGCTCCAGGGCYTCNACNCC	387
26	CCAGGGCCACAACGACTAYATGTGYCC	ACTCGGAGTAGATCATAGGGGGYTCNCGNTC	393
27	CAGTACTGCCGGCTGCARAARTGYTT	CGGCCTTCAGCAGGGTATYTGRTTC	402
28	GGTCCATCCAGAAGAACATGATHAYAC	TGGCCAGCTCGGAGAAYTTRTCCCA	432
29	GTGTCTCTGCGAGGGNTGYAARGG	ACAGGGAGGGGAAGGTCTCYTGRTGNGC	381
30	CGACCGGTCTCCGGNAARCAITA	GCCTCCAGGATCCTCTCCACNCGCATNTC	294
31	TGCGGTCCGACCCNGARGANAA	TTGAACCGGCACAGCTGRCAYTGRIT	309
32	GACCACTTACCATGATCATCACNCCNCGNRT	GAGTTCAGCTTCATGCCGARRTCRAANAT	276
33	GCTGGCCTCCCTGATGAAYAARGA	CCAGCTGCCGAGGTGNGYCATYTT	348
34	GCGCCACCGCCACNCCNYTNTG	ATCTTCCGGTTCGGGTYTGDDATNCC	300
35	CAGTGGACGGCCAGCARYTNCARTT	TTGTGATGTAGTCGTTGGCGYNGTRAARAA	444
36	GCCTCCCCACGTGCARCCNGTNMG	TGGGGCAGGACGCCRTTNCKNCC	378
37	CGACCCCAAGTCCCTCCNTKYGARGA	ACGTGGACCTTCTTCATCCANGGRTA	612
38	ACCGGCAGGTACGGCTAYRRNTAYAA	CAGGGGTAGATCTGAGGGGTYTGNCCYTC	441
39	TGAACGCCCTGTTCTCCAARTWYMCNRC	CGGAGGACCGCATCCANGGRTA	390
40	CCCCTGCACCCACCTAYTAYGAYTG	TGGGGCCGCATCCANGGRAA	483
41	GCCCATGGTGTGGCCNCGNTG	TCTTGATGCCGGTGGCYTTYTTDAT	291
42	CCCGCCGGCATGTTYWSNAT	TCAGCACGGAGCCGGSNCCNCTCRA	378
43	GAAGCAGCGGCGGAAYMGACNAC	CGGGGGACCATGGGYTGYTCNAYNG	279
44	CAACGAGTCCGAGTGCTCCSSNCARTTYAC	GCCGAGTCCATGCCNCCNMRTA	390
45	GAGTCCGGCGTGACCAARGARRYNYT	CCTCCTGCAGCATCCTGTCNACNWCNGC	306
46	GGATGAAGGTGAAGCGGAAYSYSCCNAA	TCGTTTCAGCTGCAGGGAGKYNGCDATYTC	470

47	GGCCCTGGAGCGGAARTTYMGNCA	GGGCAGGACGGGCKNTGRAANGG	294
48	CAGCACGCCGTGGGNCAAYGG	CCGCTCCAGCTCGTACACYTGNGCYTG	369
49	CGGCCTGTCCCAGCACYTNCARGAYGG	CACGGAGTTGTCCGAGCCNGCNCNC	372
50	TGACCCCTGCCTGTACAARTTYCCNGA	GGCGCCACCTGCTCNGCYTCYTC	321
51	CATGGGCAAGCTGTACGGNAAYGAYTT	CACCCGGATCACCTCCTTYTCCATRTT	228
52	CAGCTGCTGCAGCTGCARCARYTNGT	GCTTGATCCGCCGCTGYTTTRAANGT	384
53	GCACCACTTGACCCAGGCNGAYGTNGG	CCTTCTGCCGCCGGTTRCARAACCA	375
54	GGGCGTGACCCAGGCNGAYGTNGG	TGCTTCTGCCGCTGGTTRCARAACCA	390
55	GACCACCATCTGCCGGTTYGARGCNYT	CCAGCTGGTCCGGCGATRTGNSWDAT	264
56	TGGAGGAGATCCGGGAGTTYGCNAARAA	GGTCTGCCGCCGGTTRCARAACCA	309
57	CCGGGACGGCATGGTNTWYCA YNT	TGGACCGCCGGTCTGRAAACANAC	609
58	GGGCCATCGGCGGNWSNAARCC	CGGCACCGCCGCWRYTTNCKYTT	441
59	TGAACAGCTGGGCGGNGYNTTYGT	GGACACGGAGGGCACGKTRMNTTRTC	336
60	AGGCGGTCTACACCCAYGCNAARCC	GCCGCAGGTAGCAGCCRTTYTCRAA	297
61	GCTGCAGCAGTCCCCAGAYGGNGTNBT	GCAGTTGCAGATGTCCTGGYRNGTNACRTA	348
62	GCGGCACTTCTCCATGAARGTNTG	GCTGCTCGTTCTGCCTGTTNCKYTSNAC	387
63	GCTGACCCCTCTCCAARGARATGATG	CGGGGTAGGCGGGGTNRNCNCRTT	342
64	CATCCACCAAGTTCGGGATGWVNGGNCA	GGGGAAGTCCTGGTTGACGSWRCARTANKT	411
65	TGCGGAAGAACAAGACCAAYATGAA YTA	AGTACAGGCCGGAGTGCADRTANTCRTT	333
66	CCACCTCCTCCCGGCTNGCNAAYCCNG	GGGGTACTTGTACATGGAGGTCTCNGKNGGRTG	336
67	ACAAGGAGAAGATGATGTTCCGNATHCCNTGGA	ATGGCGCACCGGAAGYKNGYYTTCCA	168
68	CCGACATCGAGCAGTCTCTTYCARSARGC	GGATGTGGGAGGACACCTGYTTNCKNGT	168
69	CCAGCTGGTGGCGGACYTNYTNGARGT	TGGACATCATGGCGATGTGDATNGCRRT	315
70	CCACCGTGAAGATCTGCAAYTAYGARGG	AGCCGCACGATGGACARRTCCATNAC	339
71	CAGAGGATCCAGACCAGCATCRAYCCNTWYMA	GCGACCTGCCTGTGCACRTCNGYNTG	375
72	CCCTGCCTCCCCTGGANTGGCMNYT	GGTGATCCGGTGACCTGRTARAANGC	258
73	CTTCGTGGTGGAGAGGCARCCNTGYAT	GAAGGTGATGATGTGCAGCTCYTCNGTNAC	360
74	GCGTCGAGTGCACCGGNGARATHHT	GGCACCTTGTCGGGCACNRCRAANGG	339
75	CGAGCAGTGGTTCACAGAGGAYCCNGGNCC	CCGCCGCACCACCTCNGTCATRTG	372
76	TCCCCTCCCAGACCACNYTNCAYMG	GGTTGCCGCCGCCNGGNGGNGG	252
77	CGAGCTGTCCGTGCTGTGYGAYTGYGA	GGACAGCTCGGGCACGSDCATNGCNGG	327
78	CGAGCTGTCCGTGCTGTGYGAYTGYGA	GGGATGGTCACGGGCATYTCRAA	327
79	TGCCCCCCCCCAAYTTYGCNAT	GGTGTGTGGGTAGGAGGAGNGGNSWYTT	369
80	GCGCCAAGCCCGGNAARAARAC	CACCTGGTAGGTACAGTCGGKYCYTCRAA	348
81	CACGCCCCGAACGCNGARTAYAA	GGGGTAGATGTTCTCGAAGGCNTSRTADAT	435
82	TCAAGCGGCCCATGAAYGCNTT	GCGGGGCCGGTACTTTRTARTYNGG	213
83	CCGTGAAGCAGAACGAGGANGGNAARHT	TGGAGATGTTGGAGTTGTGCATRTCNGG	291
84	GGCCGAGCAGTACCCCSAYYTNCAYAA	ACCCGCAGCCGCTCNGCYTCYTC	117
85	CGTGCTCCCTCCGGNAARCARGA	GGACCGCCGCTTCTTCTTNCCRTARTT	336
86	GGACCAGCGGCAGATGTTYTTYGT	CACAGGGGGCTTGTGCAYRTADATRAA	354
87	TCCGGCCTGGTGCANGAYTTYGA	CTCCAGCCCTCCAGCTGYTGRTGYTC	375
88	GGTGCTGGGACCGTNAARTGGTT	GCCCCGCCGCKNCCRWARTA	288
89	CGGTCCGTGGGCGAYGGNGARAC	GCGCCCTCCATCACCTCNCYTNAC	366
90	CGTGATGGCCGGCAAYGAYGARA A	GGGAGGGCCGGGGRTTYTGNGG	339
91	CACCGCCGCCATGAARAAYCA	GGGGCTCCCGGGGNCRCNAC	366
92	CCCTGGCCTCCAAGCARGRNMARCC	GGACTCCTGGGAGATGGTCTCYTCNGTYTC	315

These primers were first produced with the help of a web program CODEHOP (consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primer) based on the known sequences of transcription factors.

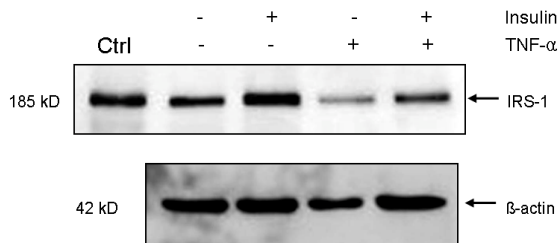


Fig. 1. Effect of *TNF-α* on protein level of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) in 3T3-L1 adipocytes by gel electrophoresis and immunoblotting (Ctrl: 3T3-L1 preadipocyte, lane 1: fully differentiated 3T3-L1 adipocyte, lane 2: adipocyte treated with 100 nM insulin for 15 min, lane 3: adipocyte treated with 3 ng/mL *TNF-α* for 48 h, lane 4: adipocyte treated with *TNF-α* and insulin).

alignment) 및 다중서열정렬(multiple sequence alignment)을 실행하여 분류 계통수를 작성한 후 그 상동성 수준에 따라 총 92개의 전사인자 소그룹으로 분류하였다.

2. 전사인자 소그룹 별 Degenerate PCR 프라이머의 구축

전사인자 mRNA 염기서열을 단백질 아미노산 서열로 변환한 후 92개 각 소그룹의 전사인자 공통 모티프를 내포하는 포괄적 degenerate PCR 프라이머를 구축하고자 원거리 관련 유전자 대상 웹 프로그램 CODEHOP^{9,10)} (consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primer, <http://blocks.fhcrc.org/codehop.html>)을 이용하여 3' 보존 퇴축 코어와 5' 비 퇴축 클램프 부위로 구성된 여러 후보 프라이머를 구하였다. 이들은 다시 프로그램 'Primer Premier 5' (Biosoft International Co.)와 Amplify 1.2 (<http://engels.genetics.wisc.edu/amplify/>)를 활용하여 해당 전사인자에 대한 가상증폭과 실행조건 일치도를 고려하여 최종적으로 인간/생쥐 전사인자 전사체 PCR 프라이머를 선발하였다.

3. 3T3-L1 지방전구세포 배양과 지방세포로 분화 유도

쥐의 지방전구세포 3T3-L1 (ATCC CL-173)는 10% fetal bovine serum (Life Technologies, Inc.)와 항생제(100 units/mL Penicillin과 100 units/mL Streptomycin)를 포함하는 DMEM (Bio Whittaker, Inc.) 기본배지에서 37°C와 이산화탄소 5% 조건의 배양기에서 배양하였다. 6-well plate에서 세포가 100%까지 자라면 이들을 더 배양한 후 이전 보고에 따라 5 µg/mL insulin, 0.75 µM dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1 methylxanthine을 첨가하여 48시간 동안 배양한 후 insulin만 첨가된 기본배지로 이틀마다 교환하여 10~14일간의 배양으로 95% 이상의 지방세포주로 분화 유도하였다²¹⁻²³⁾. 최종적으로 3T3-L1 지방세포에 인슐린저항성

을 유발하기 위해서는 3 ng/mL의 *TNF-α* (Quality Control Biochemicals Inc.)를 첨가한 배지에서 48시간 동안 배양하였다.

4. 세포 단백질 추출과 Western Blot 분석

TNF-α 처리한 세포를 차가운 PBS (pH 7.4)에 3회 씻어 Buffer (1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 0.1% NaF, 1% protease inhibitor cocktail)로 30분간 얼음에 방치한 후 원심분리(13,000 rpm, 20분간, 4°C)로 상층액을 취하였다. 정량은 BSA를 표준시료로 사용하여 BCA protein assay로 농도를 결정하였다. 세포에서 추출한 단백질을 8% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동을 시행하였다. 이후 단백질을 nitrocellulose (Amersham, UK) 막으로 이동시킨 후 항체와 단백질간의 비특이적인 결합을 방지하기 위하여 5% 탈지분유가 포함된 TTBS (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 500 mM NaCl, 0.1% Tween 20) 용액에서 1시간 반응시켰다. 이 후 5% 탈지분유가 포함된 TTBS에 1차 항체(IRS-1 Ab)와 상온에서 4시간 반응시켰다. 다시 TTBS로 수세 후 2차 항체와 1시간 반응시킨 후 chemiluminescence western blotting analysis system (Amersham, UK)을 이용하여 X-ray 필름에 감광시켜 immunoreactive band를 확인하였다. 또한 각 실험군에서 동량의 단백질로 Western blot을 시행한 것을 확인하기 위하여 β-actin항체를 사용하였다.

5. RNA의 분리정제 및 cDNA의 합성

세포를 차가운 PBS로 수세한 후 RNeasy Mini Kit (QIAGEN Inc. Germany)로 분리 정제한 다음 RNA 1 µg에 oligo-dT 프라이머 1 µL를 첨가하여 70 °C에서 5분간 열 변성시키고 4°C에서 2분간 방치한 후 1 µL RNase inhibitor, 4 µL 5× RT buffer, 2 µL dNTP, 2 µL DTT, 0.5 µL AMV의 혼합액에 첨가하여 최종 20 µL로 조정하였다. 이를 42 °C에서 1시간 동안 반응시킨 다음 95°C에서 5분간 열 변성시켜 cDNA를 합성하였다.

6. RT-PCR 및 아가로스 전기영동

전사인자의 RT-PCR은 Table 1에 기술된 forward, reverse 프라이머를 이용하여 T1 Thermocycler (Whatman Biometra Corp. Germany)로 다음과 같은 조건하에서 실시하였다. 즉, 0.2 mL PCR 튜브에 주형 cDNA 3 µL, 프라이머 20 pM, dNTP 각 200 µM, 2 µL PCR 완충액 (50 mM KCl, 10 mM pH 8.3 Tris-HCl, 2 mM MgCl₂, 0.01% Gelatin, 0.025% Nonidet P-40, 0.025% Tween-20), Taq DNA 중합효소 0.5 단위를 첨가하여 최종 20 µL로 조정한 다음 이를 94°C에서 5분간 예비 변성시킨 후 94°C에서 1분 변성, 50°C에서 1분 결합, 그리고 72°C에서 1분 신장의 총 35회를 반복하고 최종적으로 72°C에서 5분간 신장 반응하였다. 증폭산물은

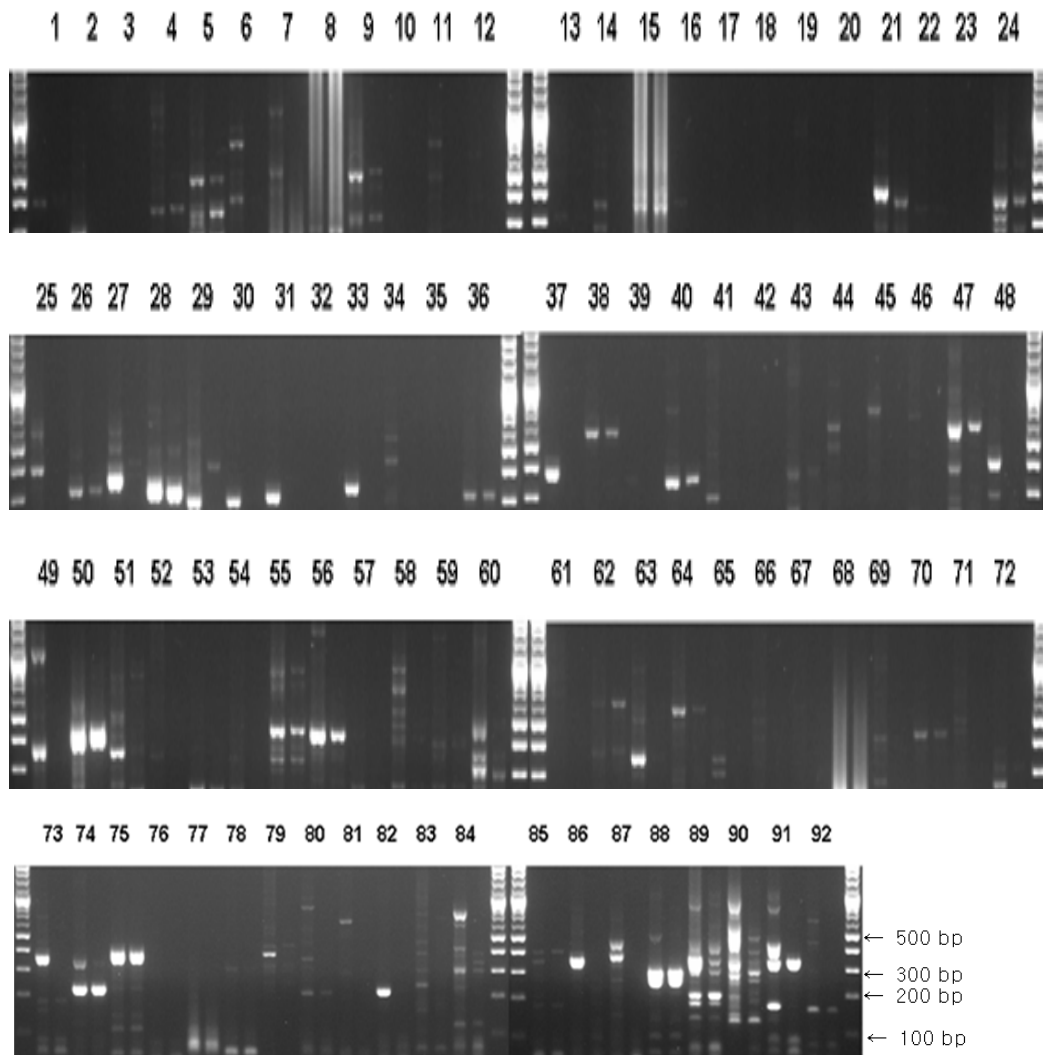


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of transcription factor degenerate RT-PCRs on total RNAs of fully differentiated 3T3-L1 adipocytes before and after TNF- α treatment. Numbers above the columns mean categorized groups of transcription factors. Each left and right column below each number shows the result of RT-PCR from 3T3-L1 adipocytes before and after TNF- α treatment, respectively. Columns without number on the top are markers for the sizes (base pair) of PCR product.

1.5% 아가로스 겔 상에서 전기영동하고 ethidium bromide 로 염색하여 UV하에서 밴드를 관찰하였다.

7. SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism)

PCR 증폭산물 3 μ L와 5배의 formamide dye (98% formamide, 20 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol)를 혼합하여 95°C에서 5분간 가열한 후 즉시 얼음조각 조에서 5분간 냉각 처리한 다음 2 μ L를 취하여 12% 변성 polyacrylamide gel (40% acrylamide solution, 10X TBE buffer, 10% ammonium persulfate, TEMED)에서 4°C 전기영동하고 실버염색 (BIONEER Corp. Korea)으로 밴드를 관찰하였다.

결 과

1. 전사인자 소그룹 92개군

1. (XBP-1, c-Jun/c-Jun, JunB, JunD), 2. (c-Fos, Fra-2/c-Fos, Fra-1), 3. (NF-E2 p45, Nrf1 long form, Nrf1 shot form, Nrf2/NF-E2 p45), 4. (CRE-BF1, CRE-BP α , ATF-a, ATF-aDelta/CRE-BF2), 5. (CREB-341/CREB-341, CREBbeta), 6. (ICER- II gamma, ICER- II/CREMalpha, CREMbeta, CREMgamma, CREMepsilon, CREMtau, CREMtaualpha, CREMtau1, CREMtau2, S-CREB, ICER- I, ICER- I gamma, ICER- II, ICER- II gamma), 7. (C/EBPalph/C/EBPalph, p30C/EBPalph, p20/EBPalph), 8. (C/EBPbeta/C/EBPbeta, p20C/EBPbeta), 9. (C/EBPdelta/C/EBPdelta), 10. (Hif), 11. (E12, E47,

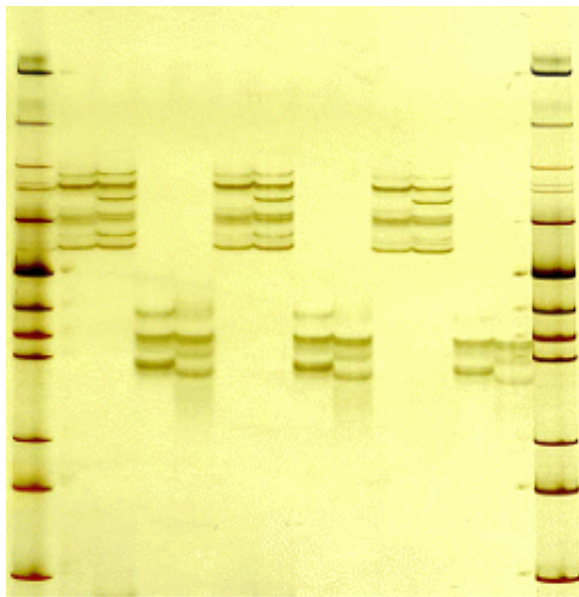


Fig. 3. SSCP (single strand conformational polymorphism) analysis of transcription factor RT-PCRs. The products, taken from 28 and 75 RT-PCRs in Fig. 2 were denatured at 96°C for 5min, cooled in ice for 5 min, and then 3 times loaded on 12% nondenaturing polyacrylamide gel.

ITF-1//E12, E47), 12. (ITF-2 / SEF2-1B, HEB /SCBP//m3, SCBPgamma, SCBPalpha), 13. (HEN1, HEN2//HEN1, HEN2), 14. (AhR, Arnt//AhR), 15. (TFE3-L,Mi//Mi, TFE3-L, TFE3-S), 16. (USF, USF2a, USF2b//USF2a, USF), 17. (SREBP-1a, SREBP-1b, SREBP-1c, SREBP-2, AP-4), 18. (c-Myc, N-Myc, L-Myc, L-Myc (206AA)//c-Myc, N-Myc, L-Myc), 19. (Max2, Max1, DeltaMax//Max), 20. (Mad1, Mxi//Mad1, Mad3, Mad4), 21. (NF-1C1/CTF-1, NF-1C2/CTF-2, CTF-3, CTF-5, CTF-7//NF-1B3, NF-1B4), 22. (RF-X2, RF-X3, RF-X5//RF-X1,RF-X2, RF-X3), 23. (AP-2alphaA /AP-2alpha1, AP-2alphaB, AP-2gamma, AP-2beta//AP-2alphaA /AP-2alpha1, AP-2alpha2, AP-2alpha3, AP-2alpha4, AP-2beta, AP-2gamma), 24. (GR, MR//GR), 25. (AR//AR), 26. (ER//ER), 27. (RAR-alpha1//RAR-alpha, RAR-alpha1, RAR-alpha2), 28. (RAR-beta2//RAR-beta, RAR-beta1, RAR-beta2, RAR-beta3, RAR-beta4), 29. (RAR-gamma, RAR-gamma1//RAR-gamma1, RAR-gamma2, RAR-gamma), 30. (RXR-beta, RXR-alpha//RXR-alpha,RXR-beta, RXR-beta2, RXR-gamma), 31. (T3R-alpha, T3R-alpha1, T3R-alpha2//T3R-alpha), 32. (T3R-beta1), 33. (PPAR-alpha, PPAR-beta, PPAR-gamma), 34. (GATA-1,GATA-3//GATA-1, GATA-3), 35. (Sp1, YY1//Sp1), 36. (//HOXA11, HOXD11), 37. (HOXA4, HOXB4, HOXD4//HOXD4, HOXA4, HOXB4), 38. (HOXC5, HOXA5, HOXB5//HOXA5, HOXB5), 39.

(HOXA7, HOXB7//HOXB7, HOXA7), 40. (//HOXB8, HOXC8, HOXD8), 41. (En-1, En-2, En-1,En-2), 42. (//Gsc), 43. (K-2//K-2a, K-2b, S8), 44. (Otx1, Otx2//Otx2, Phox-2, Otx1), 45. (HNF-1A, HNF-1B, HNA-1C, vHNF-1A, vHNF-1B, vHNF-1C//HNF-1A, vHNF-1A), 46. (HOXA1, HOXB1//HOXB1, HOXD1, HOXA1), 47. (Msx-1, Msx-2//Msx-2, Msx-1), 48. (TTF-1//TTF-1), 49. (Pbx1a, Pbx1b//Pbx1b), 50. (Pit-1b//Pit-1b), 51. (Oct-1//Oct-1A, Oct-1B, Oct-1C), 52. (Oct-2.1, Oct-2.2/Oct-2A, Oct-2.5/Oct-2B//Oct-2.1, Oct-2.2/Oct-2A, Oct-2.3, Oct-2.4, Oct-2.5/Oct-2B, Oct-2.6), 53. (N-Oct-3, N-Oct-5A, Brn-4, N-Oct-5B, Oct-6//Oct-6, Brn-4, N-Oct-3), 54. (Brn-3a(s), Brn-3b//Brn-3a(l), Brn-3a(s), Brn-3b), 55. (Oct-3A, Oct-3B//Oct-5, Oct-3A), 56. (TCFbeta1//Brn-5(c2), Brn-5(c1), Brn-5(c7)), 57. (Lim-1, LH-2//Lim-1, Lim-3, LH-2), 58. (Pax-3, Pax-6, Pax-6/Pd-5, Pax-7//Pac-3, Pax-6), 59. (Pax-1, Pax-5, Pax-8a, Pax-8b, Pax-8c, Pax-8d//Pax-1, Pax-2, Pax-5, Pax-8a), 60. (HNF-3alpha//HNF-3beta), 61. (E2F-1, E2F-2, E2F-3, E2F-4, E2F-5//E2F-1), 62. (DP-1, DP-2//DP-1, DP-3), 63. (c-Ets-1 p54, Ets-1 Delta V//c-Ets-1 p54), 64. (Ets-2//Ets-2), 65. (Elk-1, SAP-1a,SAP-2//SAP-2), 66. (Erg-1, Erg-2, p38erg//Fli-1), 67. (IRF-1, IRF-2, ISGF-3gamma//Pip, ICSBP, LSIRF-2, IRF-1, IRF-2), 68. (TEF-1), 69. (p105, p50//p50, p105), 70. (p100, p52, p49), 71. (p65, p65Delta, RelB//p65, RelB), 72. (NF-ATc, NF-Atp, NF-Atx//NF-Atc, NF-Atp,NF-Atc3), 73. (p91, p84, STAT2, STAT3//STAT3, STAT4, p91), 74. (STAT4, STAT6//STAT5A, STAT5B, STAT6), 75. (p53//p53, p53as), 76. (MEF-2A, aMEF-2, RSRFC4, RSRFC9//MEF-2A), 77. (MEF-2B1//MEF-2B1, MEF-2B2, MEF-2B3, MEF-2B4), 78. (MEF-2C, MEF-2C/Delta8, MEF-2C/Delta32//MEF-2C/Delta8), 79. (MEF-2DAB,'B, MEF-2D0B, MEF-2DA0, MEF-2DA'0, MEF-2D00/MEF-2DAB, MEF-2DA'0), 80. (SRF//SRF), 81. (TBP//TBP), 82. (SRY, Sox-4//Sox-2, Sox-4, SRY), 83. (Sox-5, Sox-9//Sox-9, Sox-18, SOX-LZ, Sox-5), 84. (Sox-9//Sox-9, Sox-18), 85. (TCF-1A, TCF-1B, TCF-1C, TCF-1D, TCF-1E, TCF-1F, TCF-1G),86. (SSRP1, SSRP1), 87. (CP2, LBP-1a//LBP-1a, CP2), 88. (DbpA, DbpAv, YB-1/DbpB/EF I//Ybx-3), 89. (YB-1/DbpB/EF I//YB-1/ DbpB/EF I), 90. (PEBP2alphaA1/AML-3//PEBP2alphaA /Osf-2, PEBP2 alphaA/ Til-1, PEBP2alphaA/Til-1(Y), PEBP2alphaA/ Til-1(U), PEBP2alphaA1/AML-3, PEBP2alphaA2), 91. (PEBP2alphaB/AML1, PEBP2alphaB1 /AML1b, AML1a, AML1c, AML1DeltaN, PEBP2alphaC1AML2//PEBP2alphaB1/AML1b, PEBP2alphaB2), 92. (HMG I, HMG Y, HMG I -C//HMG I (Y)).

고 찰

2. 전사인자 소그룹 별 Degenerate PCR 프라이머의 합성

전사인자 소그룹 92군의 PCR 프라이머는 Table 1에 기술된 바와 같다.

3. TNF- α 에 의한 IRS-1 단백질 양의 변화

3T3-L1 지방전구 세포와 완전히 분화 시킨 3T3-L1 지방 세포, 그리고 3 ng/mL의 TNF- α 를 48시간 처리한 지방세포에서 얻은 cell lysate를 Western blot을 통해 분석하였을 때 TNF- α 처리 후 IRS-1 단백질의 양이 감소하였다(Fig. 1).

4. 전사인자 전사체 Degenerate RT-PCR의 분석 효과

전사인자 RT-PCR 시스템의 분석 효과를 알아보기 위해 완전히 분화시킨 3T3-L1 세포와 TNF- α 를 처리한 3T3-L1 지방세포의 전체 RNA를 대상으로 대조실험을 수행하였다(Fig. 2). 그 결과 총 92개의 비교 PCR군 중 TNF- α 처리전과 후에 각각 82개 군과 53개 군이 증폭을 보였고 10개 군은 증폭이 관찰되지 않았다. 또한 24개 군에서 TNF- α 처리 전후에 비교적 뚜렷한 PCR 증폭의 차이를 나타내었는데, 특히 2 (c-Fos, Fra-2//c-Fos, FosB, Fra-1), 7 (C/EBPalpha//C/EBPalpha, p30C/EBPalpha, p20/EBPalpha), 8 (C/EBPbeta//C/EBPbeta, p20C/EBPbeta), 27 (RAR-alpha1//RAR-alpha, RAR-alpha1, RAR-alpha2), 29 (RAR-gamma, RAR-gamma1//RAR-gamma1, RAR-gamma2, RAR-gamma), 30 (RXR-beta, RXR-alpha//RXR-alpha, RXR-beta2, RXR-gamma), 33. (PPAR-alpha, PPAR-beta, PPAR-gamma), 71 (p65, p65Delta, RelB//p65, RelB)와 그룹 31, 37, 48, 49, 63, 73, 82, 86, 87, 91의 경우가 강한 차이를 보였다. 증폭된 전체 및 차별 발현인자의 수를 볼 때 본 연구에서 제시한 degenerate RT-PCR 조건이 3T3-L1 지방세포의 전사인자 분석에 적절하였다고 생각되며 많은 수의 전사인자의 포괄적인 발현양상을 간단히 알아볼 수 있는 screening test로 이용가능 할 것으로 생각되었다.

5. SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) 분석 결과

전사인자 degenerate RT-PCR 산물의 더 자세한 구분을 위해 단일밴드 중 무작위로 선택한 28번과 75번 프라이머의 RT-PCR 산물에 대해 SSCP 분석을 세 번 반복하여 실시해 보았다(Fig 3). 그 결과 각 산물은 아가로즈 전기영동 결과와 달리 동일 밴드 이외의 부가적 차별 밴드를 보여 degenerate RT-PCR의 제한점을 보완하는 접목기술로 SSCP 기술이 유용함을 알 수 있었다.

본 논문에서는 당뇨병과 같은 다인성 질병의 병태 생리학 연구를 위한 전사인자 전사체 분석의 실용적 방법을 확립하고자 지금까지 알려진 417개의 인간 및 생쥐 전사인자 mRNA 염기서열을 바탕으로 이들과 아직 발견되지 않은 새로운 인자의 증폭을 포괄할 수 있는 92개의 그룹별 degenerate RT-PCR을 구축하고 동일 크기 증폭산물의 염기서열에 따른 구분을 위한 SSCP 기술을 접목시켰다. degenerate RT-PCR/SSCP 방법의 가장 큰 장점은 서론에서 언급한 대로 degenerate primer를 이용함으로써 많은 전사인자들의 발현 양상을 적은 수의 PCR로 동시에 살펴 볼 수 있다는 점이다. degenerate primer는 하나의 위치에 두 개 이상의 염기가 존재하는 primer로 adenine 또는 guanine을 R, cytosine 또는 thymine을 Y, adenine 또는 cytosine은 M, adenine, thymine, cytosine은 H 등으로 표시한다. 따라서 예를 들면 degenerate primer sequence가 5'-ggM ttc ggg ccc gaR tct -3'이라면 M과 R 자리에 각각 2가지의 염기가 선택 되어 질 수 있으므로 모두 4가지 종류의 sequence가 섞여 있는 degenerate primer를 작성한 경우가 된다. 한편으로는 이러한 degenerate primer의 특성 때문에 동일 크기 증폭산물이 유사한 여러 가지의 염기서열을 포함하게 된다. 그러므로 degenerate RT-PCR을 통해 변화를 보이는 전사인자 군에서는 이어서 SSCP를 시행하고 여러 개의 band가 나오면 이들을 다시 sequencing을 통해 확인하고 확인된 전사인자의 발현의 변화를 재차 확인하는 절차가 필요하다. 따라서 특정 전사인자에 대한 집중적 분석보다는 잘 알지 못하는 전사인자 발현 양상을 찾아내어 좀더 구체적인 접근을 할 수 있는 screening test로 사용할 수 있을 것으로 사료된다. 지금까지 RT-PCR/SSCP 방법은 암 유전자의 진단, 류마티스성 질환 등, 여러 방면의 연구에서 관련된 몇몇 특정 유전자나 유전자 군을 대상으로 분석하는데 이용되어왔다^{24,25}). 본 연구에서는 이번 연구에서 처음으로 작성된 92개의 degenerate primer를 이용하여 염기 서열이 밝혀진 400개 이상의 전사인자의 발현 양상을 92개의 degenerate RT-PCR을 통해 알아보는 방법을 고안하였다. 또한 이방법의 실제 적용 가능성을 알아보기 위해 분화 시킨 3T3-L1 지방세포에 TNF- α 처리전 후의 전사인자 발현변화를 조사하고 기존의 방법으로 조사된 내용과 비교하여 보았다.

TNF- α 를 3T3-L1 지방세포에 단시간(15 min-2 hr) 동안 처리하면 IRS-1 (insulin receptor substrate-1)의 인슐린을 매개로 한 tyrosine 인산화를 촉진하고²⁰) 장시간(6 hr-5 days) 처리하면 IR (insulin receptor)와 IRS-1의 tyrosine 인산화를 감소시키는 동시에 serine 인산화를 증가시켜 IR의 tyrosine kinase activity를 방해할 뿐만 아니라 IR, IRS-1, Glut4 등의 protein소실이 함께 관찰되는데 이러한 소견들이

TNF- α 에 의해 인슐린저항성이 유발되는 분자생물학적인 기전으로 보고 되어 있다²⁶⁻²⁸). 본 연구에서도 3T3-L1 지방세포에 48시간 동안 TNF- α 를 처리하였을 때 IRS-1 단백질이 감소하는 것을 관찰하여 여러 보고자들의 결과와 일치함을 확인하였으나 이외에 인슐린저항성을 증명할 만한 부가 실험을 시행하지는 못 하였다.

Ruan 등은 3T3-L1 지방세포에 TNF- α 를 24시간 동안 처리하고 oligonucleotide microarray로 여러가지 유전자 발현양상에 미치는 영향을 조사하였는데 인슐린에 반응하는데 필요한 지방세포에 풍부한 유전자 발현을 억제하고 지방전구세포의 유전자 발현을 선택적으로 유도하는데 이들 대부분이 NF- κ B의 활성화를 통해 일어남을 보고하였다. 또한 전사인자 유전자들의 발현도 영향을 받아 지방세포와 연관된 전사인자들인 RXR- α , PPAR- γ 등이 2~3배 억제되고 지방전구세포에 정상적으로 풍부한 전사인자들인 Fra-1 등은 TNF- α 에 의해 발현이 증가 된다고 보고하였다²⁹).

본 연구에서도 앞서 보고된 바대로 TNF- α 를 장시간(48시간 이상) 처리한 후 지방 세포와 연관된 전사인자인 RXR- α , β 등이 포함된 group 30, PPAR family가 포함된 group 33의 발현이 감소하여 oligonucleotide microarray로 분석한 결과와 일치하는 결과를 보였다. Fra-1은 지방 전구세포에 풍부한 유전자로 TNF- α 처리 후 유도된다고 알려져 있으나²⁹) 본 연구에서는 Fra-1, c-Fos 등이 포함된 group 2가 오히려 억제된 것으로 나타났다. TNF- α 를 주사한 in vivo study에서는 1일간 infusion후에는 1.5배 증가하였으나 4일간 주사한 후에는 의미 있는 변화가 없었다는 보고가 있다³⁰). 따라서 본 연구에서의 결과가 다른 보고들의 결과와 차이가 나는 것은 TNF- α 를 처리한 시간의 차이에 의한 영향이 아닌가 생각되었다.

TNF- α 는 NF- κ B의 subunit 인 p105 NF- κ B³⁰), p65 NF- κ B의 mRNA를 증가시킨다²⁹). 본 연구에서는 TNF- α 처리 후 p105 NF- κ B를 포함하는 Group 69 전사인자 군은 RT-PCR 밴드가 관찰되지 않았고 RelA/p65, RelB 등이 포함된 group 71군의 경우 밴드가 관찰되었으나 크기가 다른 위치에서 관찰되었다. 이 두 군에서는 전사인자들의 grouping, degenerate primer, RT-PCR 증폭 조건 등을 재조정하는 것이 필요할 것으로 사료되었다.

TNF- α 는 완전히 분화된 3T3-L1 지방세포에서 cell cycle arrest와 progression에 관여하는 유전자의 발현을 조절한다. EBP- α 는 cell cycle의 진행을 방해하는 중요한 전사인자로서 완전히 분화된 3T3-L1 지방세포에서는 높게 발현되어 있고 CEBP- β 는 억제되어 있다^{26,27}) TNF- α 를 처리하면 CEBP- α 는 억제되고 CEBP- β 는 증가된다고 보고되어 있다²⁹). 본 연구에서도 CEBP- α 가 포함된 group 7과 CEBP- β 가 포함된 group 8에서 TNF- α 처리 후 각각 발현이 감소, 증가를 보여 oligonucleotide microarray 소견과 일치함을 알 수 있

었다.

이외에도 T3R- α 가 포함된 group 31, HOXA4, HOXB4가 포함된 group 37, Thyroid transcription factor-1이 포함된 group 48, pre B-cell leukemia transcription factor 1a (Pbx1a), Pbx1b가 포함된 group 49, 사람과 포유류에서 Y 염색체에 있는 성을 결정하는 유전자인 SRY (Sex-determining Region Y)가 포함된 group 82, G1 arrest와 apoptosis를 촉진하는 structure-specific recognition protein 1 (SSRP1)이 포함된 group 86, acute myeloid leukemia와 연관되어 있는 Polyoma virus enhancer binding protein 2 alpha B (PEBP2 α B)가 포함된 group 91이 TNF- α 처리 후 발현이 감소하여 이러한 결과에 대한 의미가 무엇인지에 관한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서 구축한 전사인자 degenerate RT-PCR 시스템을 이용해 3T3-L1 지방세포에서 살펴본 전사인자 발현양상은 oligonucleotide microarray 의한 결과와 비견할 만한 결과를 보여 앞서 언급한 몇 가지의 조정을 거쳐 이용 가능한 방법으로 생각되었다. 한편 Microarray와 본 연구에서 제시하는 방법은 유전자 발현양상을 살펴보는 screening test라는 공통점을 가지므로 real-time RT-PCR이나 Northern blotting 등의 종래의 방법을 이용한 확인이 필요하다. 일반적인 Microarray가 전체적인 유전자 발현양상을 한번에 살펴보므로 수만 개의 probe가 높은 밀도로 배열되는 반면 집중하여 특정 군의 유전자의 발현 양상만을 살펴보는 macroarray는 probe수가 작아 상대적으로 넓게 배치되는데 예를 들면 지금까지 알려진 cytokine 유전자들만을 대상으로 하거나 염증반응에 관여하는 유전자군 만을 살펴보는데 적용된다. 본 연구에서 제시한 방법은 전사인자 유전자들만을 대상으로 하므로 microarray 보다는 적용 범위가 좁아 macroarray와 유사하다고 할 수 있다. 그러나 microarray가 labeling, hybridization, image analysis, data analysis 등의 여러 단계를 거치므로 결과의 재현성이 낮을 뿐 아니라 각 단계에 여러 가지 장비가 필요하므로 비용이 많이 드는 반면 본 방법은 PCR과 전기영동이라는 기본적인 방법을 이용하므로 간단하고 비용이 저렴하다.

본 시스템은 지금까지 동정된 인간과 생쥐의 전사인자 유전자를 이용하여 정렬과 분류 계통수에 따른 각 그룹별 degenerate PCR 프라이머를 설계하였는데, 이는 개별 연구자의 연구 목적에 따라 전사인자의 목표대상과 그룹범위를 조정하거나 프라이머의 퇴축 염기 도입은 물론 PCR 실행의 일반적 제 조건을 변경하여 검출의 효과의 극대화를 꾀할 수 있을 것으로 생각된다. 본 논문에서 제시하고 있는 전사인자 RT-PCR 조건은 TNF- α 처리한 3T3-L1 지방세포에 적용하여 전체 및 차별 발현인자의 수를 볼 때 이 시스템의 사용에 적절한 예로 생각된다. 한편, SSCP 결과를 볼 때 PCR 산물의 아가로스 전기영동 방법이 목표대상의 분석에 한계

를 가지므로 다른 기술을 추가하여 PCR 증폭 산물의 미세한 염기서열 차이를 구분하는 것이 필요하다는 것을 보여준다.

본 연구는 지금까지 알려진 복잡하고 어려운 전사체 분석법과 달리 기본적인 PCR 기술을 근간으로 degenerate primer를 이용하여 실용적인 전사인자 전사체 분석법을 구축하였는데 이는 향후 타당성 검사를 거쳐 다양한 연구에 포괄적인 전사인자 전사체 분석의 screening test로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

연구배경: 당뇨병과 같은 여러 가지 다인성 질병은 해당 관련 유전자의 포괄 분석과 종합적 해석을 추구하는 전사체 학적인 접근을 요하나 현재의 전사체학 기술은 용이성, 재현성, 비용, 필요한 시료량 등의 측면에서 볼 때 실용적이지 못하여 좀더 실용적인 방법을 확립하고 그 이용 가능성을 알아보고자 하였다.

방법: 지금까지 보고된 417개의 인간/생쥐 전사인자 mRNA 염기서열을 확보하고 ClustalW 방법으로 정렬하여 분류 계통수를 작성한 후 그 상동성 수준에 따라 92개의 소 그룹으로 분류하였으며 프로그램 CODEHOP, Primer Premier, Amplify 1.2을 이용하여 전사인자 소그룹별 공통 모티프를 내포하는 92개의 degenerate RT-PCR시스템을 구축하였다. 동일 크기의 PCR증폭산물의 염기서열에 따른 구분을 위한 SSCP방법을 추가하여 완전히 분화 시킨 3T3-L1 지방세포에 TNF- α 처리 전후의 전사인자들의 발현 양상 조사에 적용하였다.

결과: 완전히 분화된 3T3-L1 지방세포에 TNF- α 처리 전과 후의 비교 조사에서 각각 82개 군, 53개 군에서 PCR 증폭이 관찰되었고 이들 중 24개 군은 TNF- α 처리 전후에 뚜렷한 증폭의 차이를 보였다. 특히 group 7, 30, 33에 포함된 지방세포와 연관된 전사인자인 CEBP- α , RXR- α , PPAR- γ 의 발현이 억제되어 있었고 지방전구세포에 풍부한 CEBP- β 를 포함하는 group 8의 발현은 증가되어 있었다. 또한 그 증폭산물의 염기서열 차이에 따른 더 자세한 분석을 위해 단일밴드 PCR 중 group 28과 75를 무작위로 선택하여 SSCP (single strand conformational polymorphism)를 시행하였을 때 아가로스 전기영동 결과와 달리 동일 밴드 이외의 부가적 차별 밴드를 보였다.

결론: 많은 수의 전사인자 전사체 분석이 동시에 가능한 degenerated RT-PCR은 분석상의 제한점을 보완하기 위해 SSCP 방법을 추가하는 것이 중요하며 이 방법을 이용한 지방세포 전사인자 전사체 분석결과는 기존에 사용하고 있는 분석법에 의한 결과와 대부분 일치하는 소견을 보여 현 전사체 분석 기술들에 비해 좀 더 용이하고 실용적인 방법으

로서 향후 타당성 검사를 거쳐 포괄적인 전사인자 전사체 분석의 screening test로 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Kiechle FL, Holland-Staley CA: *Genomics, Transcriptomics, Proteomics, and Numbers*. Arch Pathol Lab Med 127: 1089-97, 2003
2. Müller CW: *Transcription Factors: global and detailed views*. Curr Opin Struc Biol 11:26-32, 2001
3. Warren AJ: *Eukaryotic transcription factors*. Curr Opin Struc Biol 12:107-14, 2002
4. Connolly SB, Sadlier D, Kieran NE, Doran P, Brady HR: *Transcriptome profiling and the pathogenesis of diabetic complications*. J Am Soc Nephrol 14:S279-83, 2003
5. Permana PA, Del Parigi A, Tataranni PA: *Microarray gene expression profiling in obesity and insulin resistance*. Nutrition 20:134-8, 2004
6. Viguerie N, Poitou C, Cancellio R, Stich V, Clément K, Langin D: *Transcriptomics applied to obesity and caloric restriction*. Biochimie 87:117-23, 2005
7. Heinemeyer T, Chen X, Karas H, Kel AE, Kel OV, Liebich I, Meinhardt T, Reuter I, Schacherer F, Wingender E: *Expanding the TRANSFAC database towards an expert system of regulatory molecular mechanisms*. Nucleic Acids Res 27:318-22, 1999
8. Wingender E, Chen X, Hehl R, Karas H, Liebich I, Matys V, Meinhardt T, Pröß M, Reuter I, Schacherer F: *TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation*. Nucleic Acids Res 28:316-9, 2000
9. Rose TM, Schultz ER, Henikoff JG, Pietrokovski S, McCallum CM, Henikoff S: *Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences*. Nucleic Acids Res 26: 1628-35, 1998
10. Rose TM, Henikoff JG, Henikoff S: *CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design*. Nucleic Acids Res 31:3763-6, 2003
11. Cuchacovich R: *Clinical Applications of the polymerase chain reaction : An update*. Infect Dis Clin North Am 20:735-58, 2006
12. Krajewski KM, Shy ME: *Genetic testing in neuromuscular disease*. Neurol Clin 22:481-508, 2004
13. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM:

- Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. Science* 259:87-91, 1993
14. Hofmann C, Lorenz K, Braithwaite SS, Colca JR, Palazuk BJ, Hotamisligil GS, Spiegelman BM: *Altered gene expression for tumor necrosis factor alpha and its receptors during drug and dietary modulation of insulin resistance. Endocrinology* 134:264-70, 1994
15. Hamann A, Benecke H, Le Marchand-Brustel Y, Susulic VS, Lowell BB, Flier JS: *Characterization of insulin resistance and NIDDM in transgenic mice with reduced brown fat. Diabetes* 44:1266-73, 1995
16. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM: *Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. J Clin Invest* 95:2409-15, 1995
17. Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB: *The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue: regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. J Clin Invest* 95:2111-9, 1995
18. Green A, Dobias SB, Walters DJ, Brasier AR: *Tumor necrosis factor increases the rate of lipolysis in primary cultures of adipocytes without altering levels of hormone-sensitive lipase. Endocrinology* 134:2581-8, 1994
19. Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF: *Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibit insulin action. J Biol Chem* 277:1531-7, 2002
20. Guo D, Donner DB: *Tumor necrosis factor promotes phosphorylation and binding of insulin receptor substrate 1 to phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes. J Biol Chem* 271:615-8, 1996
21. Heart E, Choi WS, Sung CK: *Glucosamine-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. Am J Physiol Endocrinol Metab* 278:E103-12, 2000
22. Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R: *Tumor necrosis factor alpha is a negative regulator of resistin gene expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes. Biochem Biophys Res Commun* 288:1027-31, 2001
23. Garcia de Herreros A, Birnbaum M: *The acquisition of increased insulin-responsive hexose transport in 3T3-L1 adipocytes correlates with expression of a novel transporter gene. J Biol Chem* 264:19994-9, 1989
24. Grimwade D, Du MC, Langabeer S, Rogers J, Solomon E: *Screening for mutations of Bcl10 in leukaemia. Br J Haematol* 109:611-5, 2000
25. Zhao W, Zhang L, Kobari Y, Misaki Y, Yamamoto K: *Analysis of accumulating clonotypes of T cell in joints of a spontaneous murine model of rheumatoid arthritis. Cell Mol Immunol* 1:300-3, 2004
26. Peraldi P, Xu M, Spiegelman BM: *Thiazolidinediones block tumor necrosis factor-alpha-induced inhibition of insulin signaling. J Clin Invest* 100:1863-9, 1997
27. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM: *IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. Science* 271:665-8, 1996
28. Stephens JM, Lee J, Pilch PF: *Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor mediated signal transduction. J Biol Chem* 272:971-6, 1997
29. Ruan H, Hacohen N, Golub TR, Van Parijs L, Lodish HF: *Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory. Diabetes* 51:1319-36, 2002
30. Ruan H, Miles PDG, Ladd CM, Ross K, Golub TR, Olefsky JM, Lodish HF: *Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor-alpha: implications for insulin resistance. Diabetes* 51:3176-88, 2002